

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
Laboratoř forenzní analýzy biologicky aktivních látek
a
Národní ústav duševního zdraví

Stanovení vybraných fytoKANabinoidů v olejové matrici

Alžběta Nemeškalová, Martin Kuchař

Praha, 2020

Odkaz na příslušný projekt výzkumu a vývoje, dotační program:

Metodika byla zpracována za finanční podpory Ministerstva vnitra České republiky v rámci řešení projektu bezpečnostního výzkumu VI20172020056: Nové syntetické drogy – komplexní mezioborové výzkumné centrum a podpory programu NPU I Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky v projektu LO1611: Sustainability for the National Institute of Mental Health.

Obsah

1	Cíl a oblast uplatnění metodiky v praxi.....	4
2	Teoretický úvod.....	5
3	Popis metodiky	6
3.1	Popis a struktura stanovovaných analytů	6
3.2	Použité přístroje a laboratorní pomůcky	7
3.3	Chemikálie a spotřební materiál.....	7
3.4	Příprava roztoků standardů a vnitřních standardů	8
3.5	Příprava olejů před UHPLC-UV-MS/MS analýzou	8
3.6	Příprava kalibračních roztoků	9
3.7	UHPLC-UV-MS/MS metoda.....	10
3.8	Analýza reálných vzorků	12
4	Validační parametry metody.....	13
4.1	Limit detekce (LOD), limit kvantifikace (LOQ) a kalibrační rozsah	13
4.2	Výtěžnost a matriční efekt	13
4.3	Správnost a preciznost stanovení.....	14
5	Novost metodiky	15
6	Ekonomické aspekty	15
7	Seznam související literatury	16
8	Seznam publikací, které předcházely metodice	16
9	Souhlas žadatele s bezplatným využitím metodiky v policii, který je udělen po předchozím projednání s autorem/autory metodiky.....	16
10	Přílohy	17

1 Cíl a oblast uplatnění metodiky v praxi

Cílem bylo vyvinout, optimalizovat a validovat analytickou metodu vhodnou pro stanovení vybraných fytkanabinoidů ve vzorcích oleje, používaných pro potravinářské účely i jako doplňky stravy. Jedná se o stanovení kanabidiolu, tetrahydrokanabinolu, kanabidiolové kyseliny, tetrahydrokanabinolové kyseliny, kanabigerolu, kanabigerolové kyseliny, kanabidivarinu a kanabinolu. Použita je kapalinová chromatografie s UV detekcí, následována tandemovou hmotnostní spektrometrií. Jedná se o spojení běžně dostupných metod.

Metoda může být použita pro hodnocení obsahu významných kanabinoidů v komerčních vzorcích olejů.

2 Teoretický úvod

S rostoucím zájmem o léčebné účinky konopí setého (*Cannabis sativa* L.) roste i popularita konopných potravin a doplňků stravy. Vzhledem k vysoké lipofilitě obsahových látek jsou tyto produkty jsou často dostupné ve formě olejů, a to jak konopných olejů lisovaných ze semen, nebo jako směsi olejů obohacené o konopné extrakty. Produkty tak obsahují kromě nenasyčených mastných kyselin i tzv. fytkanabinoidy s širokým spektrem účinků.

Z legislativního pohledu se mezi nejvýznamnější řadí tetrahydrokanabinol (THC), který je pro své psychoaktivní účinky zařazen na Seznamu psychotropních látek dle Nařízení vlády č. 463/2013 Sb., a jeho množství je v konečném produktu limitováno. Ačkoliv Evropská asociace pro technické konopí (EIHA) doporučuje pro THC limit 10 µg/g, v ČR není přesně stanovená hranice a maximální hodnoty jsou dále upravovány dle předpokládané denní dávky konkrétního produktu. Výsledná hodnota je uváděna jako součet dvou isomerních forem, Δ^8 -THC a Δ^9 -THC, a v některých odůvodněných případech je do celkové hodnoty započítán i nepsychoaktivní prekurzor, tetrahydrokanabinolová kyselina (THCA), která přechází na THC dekarboxylací za vysoké teploty.

Mezi další významné kanabinoidy patří nepsychoaktivní kanabidiol (CBD), který je inzerován pro své protizánětlivé, imunomodulační a anxiolytické účinky. Jeho obsah může dosáhnout až na desítky mg/g konečného produktu, je tedy často mnohonásobně vyšší než obsah THC, THCA i ostatních minoritních kanabinoidů, jako např. kanabigerolu (CBG), kanabigerolové kyseliny (CBGA), kanabidivarinu (CBDV) nebo kanabinolu (CBN). Jedná se tedy o široké rozmezí hladin kanabinoidů, které musí úspěšná analytická metoda pokrýt.

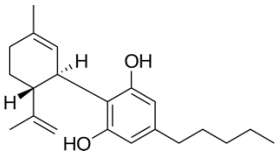
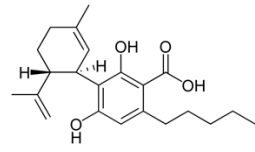
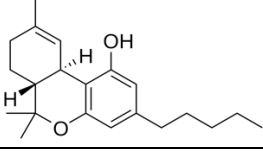
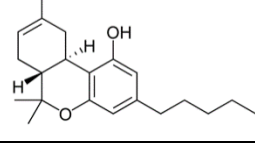
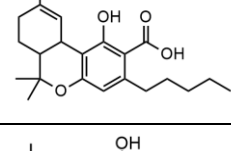
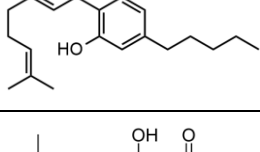
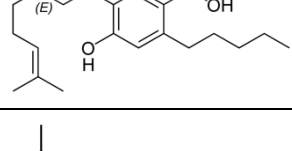
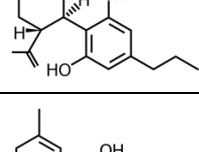
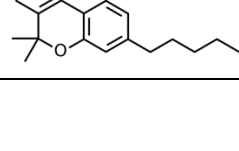
Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC) umožňuje rychlou analýzu za spotřeby minimálního množství rozpouštědel. UV detekce je robustní detekční metoda vhodná pro vysoké hladiny analytů, zatímco tandemová hmotnostní (MS/MS) spektrometrie umožňuje citlivé stanovení kontaminantů a minoritních látek. Tato práce předkládá analytickou metodu založenou na spojení výše uvedených postupů (UHPLC-UV-MS/MS) pro stanovení kanabinoidů v olejích. V rámci jedné chromatografické analýzy tak může být stanoven vysoký obsah CBD a řádově až 10 000× nižší obsah THC a dalších kanabinoidů. Příprava vzorků před analýzou je založena na prostém ředění, které je upraveno tak, aby byly splněny minimální kvantifikační limity doporučené EIHA. Kvantifikace je prováděna pomocí kalibračních roztoků standardů.

3 Popis metodiky

3.1 Popis a struktura stanovovaných analytů

Základní charakteristiky devíti stanovovaných kanabinoidů jsou uvedeny v **Tabulce 1**.

Tabulka 1 Popis a struktura stanovovaných analytů

Název analytu	CAS číslo	Molekulová hmotnost	Sumární vzorec	Strukturální vzorec
Kanabidiol (CBD)	13956-29-1	314.46	$C_{21}H_{30}O_2$	
Kanabidiolová kyselina (CBDA)	1244-58-2	358.47	$C_{22}H_{30}O_4$	
Δ^9 -Tetrahydrokanabinol (Δ^9 -THC)	1972-08-3	314.46	$C_{21}H_{30}O_2$	
Δ^8 -Tetrahydrokanabinol (Δ^8 -THC)	5957-75-5	314.46	$C_{21}H_{30}O_2$	
Tetrahydrokanabinolová kyselina (THCA)	23978-85-0	358.47	$C_{22}H_{30}O_4$	
Kanabigerol (CBG)	25654-31-3	316.48	$C_{21}H_{32}O_2$	
Kanabigerolová kyselina (CBGA)	25555-57-1	360.49	$C_{22}H_{32}O_4$	
Kanabidivarin (CBDV)	24274-48-4	286.41	$C_{19}H_{26}O_2$	
Kanabinol (CBN)	521-35-7	310.43	$C_{21}H_{26}O_2$	

3.2 Použité přístroje a laboratorní pomůcky

Analytické váhy ABT 220-5DM (Kern, Německo)

Centrifuga Hettich Universal 320R (Hettich, Německo)

Centrifugační PVDF filtry MicroSpin o porozitě 0,22 μm (Ciro, USA)

Mikrozkumavky o objemu 1,5 ml (Eppendorf, Německo)

Odměrné baňky o objemu 5 ml

Automatické pipety 0,5-10 μl , 10-100 μl , 100-1000 μl (Biohit, Finsko)

UHPLC-UV-MS/MS systém:

- Kapalinový chromatograf 1290 Infinity (Agilent Technologies, USA)
- Detektor diodového pole 1290 Infinity DAD (Agilent Technologies, USA)
- Hmotnostní spektrometr 6460 QqQ (Agilent Technologies, USA)
- Analytická kolona Poroshell EC-C18, 100 mm x 2,1 mm, 2,7 μm , s předkolonou (Agilent Technologies, USA)

3.3 Chemikálie a spotřební materiál

Roztoky standardů:

- CBDA, 1 mg/ml v methanolu (Merck, Německo)
- CBGA, 1 mg/ml v methanolu (Merck, Německo)
- CBDV, 1 mg/ml v methanolu (Merck, Německo)
- THCA, 1 mg/ml v methanolu (Merck, Německo)
- CBG, 1 mg/ml v methanolu (Merck, Německo)
- CBD, 1 mg/ml v methanolu (Merck, Německo)
- Δ^8 -THC, 1 mg/ml v methanolu (Merck, Německo)
- Δ^9 -THC, 1 mg/ml v ethanolu (Lipomed, Švýcarsko)
- CBN, 1 mg/ml v methanolu (Lipomed, Švýcarsko)

Roztoky deuterovaných vnitřních standardů:

- Δ^9 -THC-d3, 1 mg/ml v methanolu (Merck, Německo)
- CBD-d3, 1 mg/ml v methanolu (Merck, Německo)
- CBN-d3, 100 $\mu\text{g/ml}$ v methanolu (Lipomed, Švýcarsko)

Rozpouštědla a aditiva

- Ethylacetát HPLC čistoty (Merck, Německo)
- Acetonitril LC-MS čistoty (Honeywell, USA)
- Isopropanol LC-MS čistoty (Honeywell, USA)

- Kyselina octová LC-MS čistoty (Fluka, Švýcarsko)
- Octan amonný LC-MS čistoty (Fluka, Švýcarsko)
- Deionizovaná voda získána systémem Smart2Pure (Thermo Fisher Scientific, USA)

Matrice bez obsahu analytů:

- Olivový olej lékopisné čistoty

Pozn.: Je možné použít chemikálie a materiál odpovídající kvality od jiného dodavatele.

3.4 Příprava roztoků standardů a vnitřních standardů

Z roztoků standardů a vnitřních standardů se připraví směsný roztok v methanolu, který obsahuje CBDA, CBGA, CBDV, THCA, CBG, CBD, CBN, Δ^8 -THC a Δ^9 -THC o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ a vnitřní standardy CBD-d3, CBN-d3 a Δ^9 -THC-d3 o koncentraci 25 ng/ml . Výsledný roztok je skladován při $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Každý pracovní den se připraví čerstvé roztoky vnitřních standardů v rozpouštědlech pro extrakci. Jedná se o dva směsné roztoky CBD-d3, CBN-d3 a Δ^9 -THC-d3 o koncentraci 25 ng/ml , jeden ve směsi ethylacetát/isopropanol (1:1 v/v) a druhý ve směsi acetonitril/voda (3:2 v/v).

3.5 Příprava olejů před UHPLC-UV-MS/MS analýzou

Před samotnou analýzou je vzorek naředěn vhodným rozpouštědlem tak, aby byl v nejvyšší míře potlačen efekt matrice, ale zároveň byly dosaženy limity pro citlivost stanovení. Očekávané koncentrace analytů v produktu jsou v rozmezí 1–60 000 $\mu\text{g/g}$ pro CBD a 1–400 $\mu\text{g/g}$ pro THC a ostatní minoritní kanabinoidy. Vzorky jsou připravovány ve třech opakováních. Společně se vzorky olejů je zpracován alespoň jeden kontrolní vzorek olivového oleje bez obsahu analytů, který slouží jako kontrola případné kontaminace během přípravy.

Postup: Olej se homogenizuje mícháním, naváží se 250 mg do 5 ml odměrné baňky a doplní se po rysku roztokem vnitřních standardů na hladině 25 ng/ml ve směsi ethylacetát/isopropanol (1:1 v/v, viz sekce 3.4). Baňka je po dobu 15 min intenzivně míchána. Poté je odebráno 50 μl vzniklého roztoku a smícháno s 950 μl roztoku vnitřních standardů na hladině 25 ng/ml ve směsi acetonitril/voda (3:2 v/v, viz sekce 3.4). Roztok je po promíchání filtrován pomocí centrifugačních PVDF filtrů a převeden do HPLC vialky. Výsledný roztok může být skladován při $4\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu až tří dnů.

3.6 Příprava kalibračních roztoků

Ze zásobního roztoku devíti standardů je kalibrace připravena ředěním pomocí roztoku vnitřních standardů na hladině 25 ng/ml ve směsi acetonitril/voda (3:2 v/v, viz sekce 3.4). Výsledné roztoky tedy obsahují rostoucí koncentraci analytů a konstantní koncentraci vnitřních standardů. Koncentrační hladiny jsou uvedeny v **Tabulce 2**.

Tabulka 2 Kalibrační body pro MS/MS měření směsi devíti analytů

Rozpouštědlo	Bod kalibrace	Koncentrace jednotlivých analytů [ng/ml]	Koncentrace vnitřních standardů [ng/ml]
Směs acetonitril/voda (3:2, v/v)	Zero	0	25
	Nekvantifikuje se	0,5	25
	Nekvantifikuje se	1	25
	Cal 1	2,5	25
	Cal 2	5	25
	Cal 3	10	25
	Cal 4	25	25
	Cal 5	50	25
	Cal 6	100	25
	Cal 7	250	25
Cal 8	500	25	
Cal 9	1000	25	

Pro měření vyšších hladin CBD je kalibrace dále rozšířena o další kalibrační body pro samotné CBD. Tato kalibrace je určena pro UV měření, neobsahuje tedy deuterované vnitřní standardy. Koncentrační hladiny jsou uvedeny v **Tabulce 3**.

Tabulka 3 Kalibrační body pro CBD

Rozpouštědlo	Bod kalibrace	Koncentrace CBD [μ g/ml]	Koncentrace vnitřních standardů
Směs acetonitril/voda (3:2, v/v)	CBD Cal 1	1	-
	CBD Cal 2	2,5	-
	CBD Cal 3	5	-
	CBD Cal 4	10	-
	CBD Cal 5	25	-
	CBD Cal 6	50	-
	CBD Cal 7	100	-
	CBD Cal 7	150	-

3.7 UHPLC-UV-MS/MS metoda

Pro analýzu je použita kapalinová chromatografie s UV a tandemovou hmotnostní detekcí. Podmínky kapalinové chromatografie jsou uvedeny v **Tabulce 4**, parametry UV a MS detekce jsou uvedeny v **Tabulce 5**, MRM přechody, retenční časy a použité vnitřní standardy jsou uvedeny v **Tabulce 6**.

Tabulka 4 Podmínky kapalinové chromatografie

Přístroj	Agilent 1290 Infinity		
Kolona	Poroshell 120 EC-C18 (2,1 mm x 100 mm; 2,7 µm) s předkolonou		
Mobilní fáze	A: 10mM octan amonný 0,1 % kyselina octová (v/v) 5 % methanol ve vodě (v/v) B: 5 % methanol v acetonitrilu (v/v)		
Průtok mobilní fáze	0,4 ml/min		
Objem nástřiku	4 µl		
Teplota kolony	35 °C		
Gradientová eluce	Čas (min.)	A (%)	B (%)
	0,0	40	60
	0,5	40	60
	3,0	25	75
	5,0	20	80
	5,2	0	100
	6,0	0	100
	8,0	40	60

Tabulka 5 Parametry detekce pomocí UV a hmotnostní spektrometrie

UV detektor	Agilent Infinity 1290 DAD
MS detektor	Agilent 6460 QqQ
Vlnová délka	235 nm
Ionizace	ESI+
MS mód	Multiple reaction monitoring (MRM)
Drying gas temperature (N ₂)	350 °C
Drying gas flow (N ₂)	12 l/min
Nebulizer	50 psi
Sheath gas temperature (N ₂)	400 °C
Sheath gas flow (N ₂)	12 l/min
Capillary voltage	5500 V
Nozzle voltage	500 V

Tabulka 6 MRM přechody se zvýrazněným kvantifikačním fragmentem, retenční čas a vnitřní standard použitý pro kvantifikaci

Analyt (MRM přechody)	Retenční čas (min)	Vnitřní standard
CBDA (359,2 → 341,2, 219,1, 261,2)	2,3	CBD-d3
CBGA (361,2 → 219,0, 343,2)	2,4	CBD-d3
CBDV (287,2 → 165,0, 123,0)	3,0	CBD-d3
THCA (359,2 → 341,2, 219,1, 261,2)	3,5	Δ^9 -THC-d3
CBG (317,0 → 193,0, 123,0)	4,0	CBD-d3
CBD (315,2 → 193,1, 123,1, 77,1)	4,1	CBD-d3
CBN (311,2 → 223,1, 293,2, 195,1)	5,2	CBN-d3
Δ^9 -THC (315,2 → 193,1, 123,1, 77,1)	5,8	Δ^9 -THC-d3
Δ^8 -THC (315,2 → 193,1, 123,1, 77,1)	5,9	Δ^9 -THC-d3
CBD-d3 (318,2 → 196,0, 123,0, 81,0)	4,1	-
CBN-d3 (314,3 → 223,2, 195,)	5,2	-
Δ^9 -THC-d3 (318,2 → 196,0, 123,0, 81,0)	5,8	-

3.8 Analýza reálných vzorků

Před analýzou je nezbytné promýt kolonu a uvést systém do výchozích podmínek metody (tj. ustálení teploty, tlaku, průtoku, složení mobilní fáze).

Vlastní analýza zahrnuje sekvenci následujících nástřiků:

1. rozpouštědlo: směs acetonitril/voda (3:2 v/v)
2. zpracovaný olivový olej bez obsahu analytů
3. standardy analytů pro kontrolu citlivosti (zero, 0,5, 1 ng/ml)
4. kalibrační řada v pořadí rostoucí koncentrace (2,5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 ng/ml)
5. rozšířená kalibrační řada pro CBD v pořadí rostoucí koncentrace (1, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100, 150 µg/ml)
6. rozpouštědlo
7. extrakty studovaných vzorků
8. po každém vzorku ve třech opakováních je vloženo rozpouštědlo
9. kalibrační řada je zařazena na konci sekvence *nebo* po každých třiceti nástřicích

Analýza je považována za úspěšnou za následujících předpokladů:

- signál v rozpouštědle je ≤ 20 % signálu nejnižšího bodu kalibrace
- odchylka v retenčních časech je menší než $\pm 0,5$ %
- kalibrační řada je lineární s obecnou rovnicí $y = ax + b$
- odchylka a i b mezi jednotlivými kalibracemi ≤ 20 %

Pro kvantifikaci se používá poměr ploch signálů analytu a deuterovaného vnitřního standardu vzhledem ke koncentraci. Množství analytu ve studovaném oleji se vypočítá dle vztahu:

$$x = \frac{c \times 100}{\text{navážka [mg]}}$$

Kde: x ... množství analytu na 1 g oleje [$\mu\text{g/g}$]

c ... koncentrace analytu ve vialce určená dosazením do kalibrační řady [ng/ml]

4 Validační parametry metody

4.1 Limit detekce (LOD), limit kvantifikace (LOQ) a kalibrační rozsah

Limit detekce (LOD) se určuje jako nejnižší bod, který má poměr signálu k šumu > 3 a zároveň splňuje podmínky pro identifikaci (viditelnost všech MRM přechodů a odpovídající poměr jejich intenzit). Limit kvantifikace (LOQ) je nejnižší bod kalibrace, který má poměr signálu k šumu > 10 a zároveň splňuje podmínky pro správnost (80–120 %) a preciznost (≤ 20 %).

Tabulka 7 uvádí LOD, LOQ, lineární rozsah pro MS měření a lineární rozsah rozšířené kalibrace pro CBD, která je vyhodnocena pomocí UV detektoru. Přepoččet hodnot v rozpouštědle na hodnoty v olejové matrici probíhá pomocí vztahu uvedeného v sekci 3.8.

Tabulka 7 LOD, LOQ a lineární rozsah kalibračních řad

Analyt	MS	MS	MS	UV
	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	Lineární rozsah (ng/ml)	Lineární rozsah ($\mu\text{g/ml}$)
CBDA	0,5	2,5	2,5–500	-
CBGA	2,5	10	10–1000	-
CBDV	0,5	2,5	2,5–1000	-
THCA	1	2,5	2,5–1000	-
CBG	0,5	2,5	2,5–1000	-
CBD	0,5	2,5	2,5–1000	1–150
CBN	0,5	2,5	2,5–1000	-
Δ^9 -THC	0,5	2,5	2,5–1000	-
Δ^8 -THC	1	2,5	2,5–1000	-

4.2 Výtěžnost a matriční efekt

Pro hodnocení výtěžnosti a matričního efektu byl použit olivový olej. Výtěžnost byla hodnocena porovnáním ploch pod píkem u oleje, který byl obohacen o analyty před extrakcí a po extrakci. Hodnocení probíhalo na hladině 150 ng/ml. Matriční efekt byl hodnocen porovnáním ploch pod píkem u oleje, který byl po extrakci obohacen o analyty, a standardů v rozpouštědle. Hodnocení probíhalo na hladině 30 ng/ml. Výsledné hodnoty výtěžnosti a matričního efektu uvádí **Tabulka 8**.

Tabulka 8 Hodnoty výtěžnosti a matričního efektu

Analyt	Výtěžnost [%] (n=3)	Matriční efekt [%] (n=3)
CBDA	96,2	108,8
CBGA	96,8	108,5
CBDV	95,7	105,7
THCA	92,2	107,0
CBG	91,8	107,7
CBD	94,0	105,0
CBN	92,3	109,1
Δ^9 -THC	99,3	103,5

4.3 Správnost a preciznost stanovení

Pro určení správnosti stanovení byly použity olivový olej s přidávanými standardy studovaných analytů v předpokládané výsledné koncentraci 15 a 150 ng/ml. Pro CBD byl rozsah rozšířen o koncentraci 15 μ g/ml. Pro hodnocení jsou využívány poměry ploch analytů a vnitřních standardů. Správnost je vyjádřena jako relativní chyba vzhledem k dané nominální hodnotě. Preciznost je vyjádřena jako opakovatelnost a charakterizována jako relativní směrodatná odchylka (RSD) získaná opakovanou analýzou extraktů uvedených výše. Výsledné hodnoty správnosti a preciznosti uvádí Tabulka 9.

Tabulka 9 Hodnoty správnosti a preciznosti

Analyt	Správnost [%] (n=3)			Preciznost [%RSD] (n=3)		
	15 ng/ml	150 ng/ml	15 μ g/ml	15 ng/ml	150 ng/ml	15 μ g/ml
CBDA	91,6	87,6	-	0,6	1,6	-
CBGA	110,1	82,9	-	1,3	1,8	-
CBDV	87,6	85,9	-	2,4	2,5	-
THCA	88,1	82,9	-	3,0	1,7	-
CBG	113,9	105,8	-	3,3	1,7	-
CBD	89,9	82,5	94,8	1,0	0,7	7,7
CBN	95,6	91,0	-	0,9	2,5	-
Δ^9 -THC	102,9	91,4	-	1,2	3,0	-

5 Novost metodiky

S rostoucí popularitou potravin a doplňků stravy na bázi konopí roste i potřeba jejich spolehlivé analýzy. Úspěšná metoda musí být univerzální a pokrýt široké rozmezí koncentrací stanovovaných látek. Dosud publikované metody používají jeden detektor s omezeným rozsahem – jeden vzorek se širokým rozmezím koncentrací kanabinoidů je pak analyzován pomocí několikanásobného ředění a opakovaných nástřiků. Spojením dvou detektorů s různou citlivostí nám umožnilo analyzovat vzorky s širokým rozsahem analytů v rámci jednoho měření, což má pozitivní vliv na dobu a cenu analýzy. Metoda umožňuje stanovit THC a ostatní minoritní kanabinoidy s citlivostí, který je doporučována EIHA, a zároveň je vhodná pro analýzu běžných vzorků olejů s vysokým obsahem CBD.

6 Ekonomické aspekty

Zavedení metodiky vyžaduje dostupnost potřebné instrumentace. Nezbytné je také pravidelné ověřování pracovních charakteristik dle požadovaných kritérií daného pracoviště. Další náklady zahrnují příspěvek na nákup chemikálií, referenčních standardů a spotřebního materiálu, a dále na režii přístroje.

7 Seznam související literatury

L.A. Ciolino, T.L. Ranieri, A.M. Taylor, Commercial cannabis consumer products part 2: HPLC-DAD quantitative analysis of cannabis cannabinoids, *Forensic Sci. Int.* 289 (2018) 438-447.

Q. Meng, B. Buchanan, J. Zuccolo, M.-M. Poulin, J. Gabriele, D.C. Baranowski, A reliable and validated LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of 4 cannabinoids in 40 consumer products, *PLoS One* 13(5) (2018) e0196396.

8 Seznam publikací, které předcházely metodice

Nemeškalová, A.; Hájková, K.; Jurásek, B.; Mikulů, L.; Sýkora, D.; Kuchař, M. In search of psychoactive THC in cannabis-based dietary supplements. TIAFT 2019 Congress, Birmingham, UK, 2.–6.9.2019.

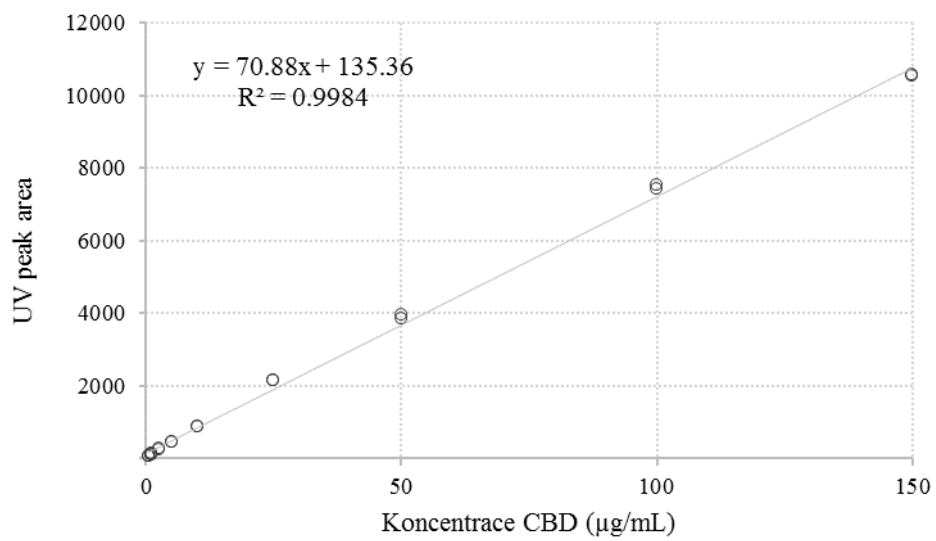
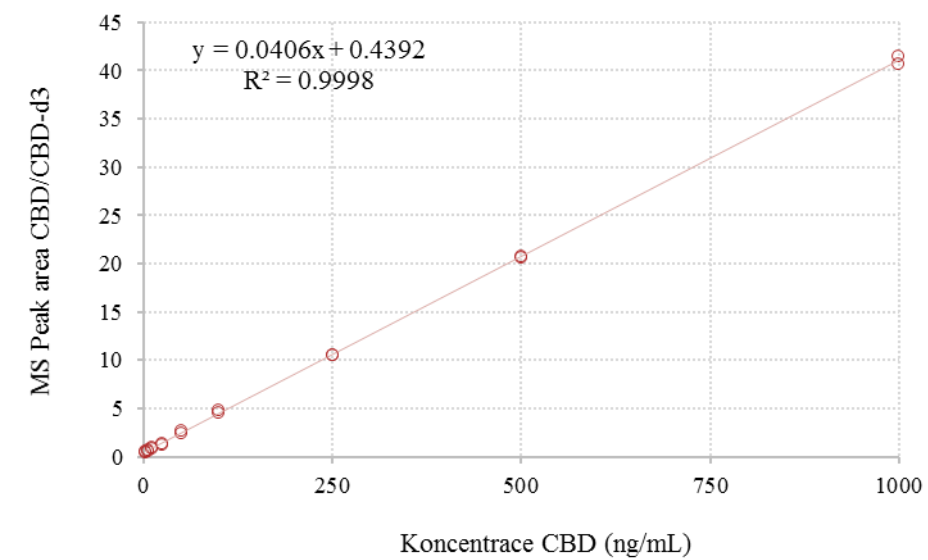
9 Souhlas žadatele s bezplatným využitím metodiky v policii, který je udělen po předchozím projednání s autorem/autory metodiky

Žadatel vyslovuje souhlas s bezplatným používáním této metodiky v chemických laboratořích PČR a Laboratoři forenzní analýzy biologicky aktivních látek, Vysoké školy chemicko-technologické v Praze

10 Přílohy

Příloha 1:

Ukázka kalibrační závislosti pro CBD při měření s pomocí UV i MS detektoru:



Příloha 2:

Výsledné chromatogramy pro MS (std 100 ng/ml) i UV (std CBD 150 µg/ml) měření:

